

慢性乙型病毒性肝炎中医虚实辨证的分子生物学研究概述

李白雪 张传涛 张莉敏 张技 冯全生

【摘要】 中医药对慢性乙型病毒性肝炎(慢乙肝)治疗已积累了丰富的经验,而邪实正虚是中医临床慢性乙型病毒性肝炎基本病机特点,在传统中医四诊辨证的基础上,将现代分子生物学理论及技术,与慢乙肝中医虚实辨证相结合,通过比较慢乙肝中医常见虚证与实证之间在乙肝病毒基因型及变异、人类白细胞抗原等位基因多态性、以及转录组、蛋白组学等系统生物学等方面分子生物学领域的差异性,揭示慢乙肝虚实证型之间分子生物学意义,为慢乙肝的中医临床辨证分型和个体化治疗提供新的参考依据,同时也为中医慢乙肝辨证客观化和药物作用机制研究奠定基础。

【关键词】 慢性乙型病毒性肝炎; 分子生物学; 中医辨证

【中图分类号】 R512.6+2 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.11.023

Overview of molecular biology research on differentiation of TCM syndromes of deficiency and excess on chronic hepatitis B Li Bai-xue, ZHANG Chuan-tao, ZHANG Li-min, et al. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

Corresponding author: ZHANG Chuan-tao, E-mail: zct801012@126.com

【Abstract】 Traditional Chinese medicine (TCM) has accumulated rich experience in the aspect of treating chronic hepatitis B, and the pathological basis of chronic hepatitis B (CHB) is excessive evil qi and deficient vital qi in TCM clinical practice. Based on the four diagnostic methods of TCM, this research combines the molecular biology's theory and techniques, and the deficiency and excess syndrome differentiation, through comparing CHB molecular biology difference between the deficiency and excess syndromes in the aspects of hepatitis B virus (HBV) genotypes and variations, human leukocyte antigen (HLA) alleles polymorphism and systems biology, it reveals the molecular biology meaning, and it provides the scientific foundation of CHB's TCM syndrome differentiation and individual therapy, and it will also lay the foundation for the study of the objection of syndrome classification in TCM and the mechanisms of drug effect.

【Key words】 Chronic hepatitis B; Molecular biology; TCM syndrome differentiation

慢性乙型病毒性肝炎(慢乙肝)是发病率高、病程长、难治愈、易反复的常见传染病之一,呈全球流行性,中国是乙肝高流行区,目前仍然大约有 9300

万乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者,慢乙肝若没有得到及时有效治疗,患者将很快进展至肝脏失代偿、肝硬化及其一系列并发症,给人类健康和社会经济都带来了沉重的负担。中医药防治慢乙肝已有悠久历史,积累了丰富的经验,在调节机体免疫^[1]、抗纤维化^[2]和抑制病毒^[3]方面均具有确切疗效,而辨证论治是中医治疗的关键也是精髓,通过分子生物学手段揭示慢乙肝中医证型的生物学本质,对于中医药治疗慢乙肝宝贵经验推广和临床水平提高都具有重要意义。

慢性乙型病毒性肝炎属于现代医学名称,中医学并无此病名,但在历代医籍中可见大量文献类似病证记载,如“胁痛”、“黄疸”、“鼓胀”等。本病病

基金项目:国家科技重大专项(2012ZX10005001);国家自然科学基金(81202624);国家教育部博士点基金(20115132120004)

作者单位:610075 成都中医药大学基础医学院[李白雪(博士研究生)、张技(博士研究生)、冯全生];成都中医药大学附属医院感染科(张传涛、张莉敏)

作者简介:李白雪(1983-),女,2011 级在读博士研究生。研究方向:中西医结合基础(中医肝病证候生物学方向)。E-mail: baixuelee@163.com

通讯作者:张传涛(1981-),博士,主治医师。研究方向:中西医结合感染病专业。E-mail: zct801012@126.com

因病机复杂及病程缠绵,故临床证型繁多,其中以肝胆湿热、肝郁脾虚、肝肾阴虚、瘀血阻络和脾肾阳虚五型多见。从临床病证结合模型出发,用分子生物学手段研究慢乙肝常见证型的基因结构、转录和表达调控,探讨基因转录、蛋白质表达的规律性及功能多样性与中医证型之间的关系,为慢乙肝中医证型提供分子生物学基础。

邪实正虚是慢乙肝基本病机特点,《素问·通评虚实论》的“邪气盛则实,精气夺则虚”,邪指湿邪、热毒、瘀血、气滞等多种病因,结合慢乙肝病证特点,可考虑为现代医学乙型肝炎病毒侵袭、炎症反应介质及细胞因子等多种致病因素;而正气,是与邪气相对而言的,指人体的气、血、津、液、精、神等物质与各脏腑经络协同发挥的正常生理功能,结合现代医学对慢乙肝病理病机认识,多从机体免疫功能相关病理生理改变角度探讨。实证则是多种致病因素致病,同时免疫功能处于正常状态,而虚证则是以机体免疫功能失调为主要表现。对于慢乙肝的发病过程的认识,中医学认为多由感染湿热疫毒之邪熏蒸所致^[4],是致病的根源,湿热之邪蕴于肝胆,肝胆疏泄失常,湿热之邪影响脾胃,脾胃运化失常,湿热之邪往往贯穿于本病发生发展的整个过程。肝气不疏横逆乘脾,脾气虚弱,肝郁日久,因乙癸同源而及肾,出现肝肾不足,凡此种种,皆有正虚,虚实是本病辨证的基本点。笔者主要讨论从虚证、实证两个方面以分子生物学理论和技术探索慢乙肝辨证分型分子机制的研究。

1 乙肝病毒基因型及变异与中医虚实辨证关系研究

目前已发现的HBV基因型有A-H共8型,其中基因B和C型主要分布在亚洲地区,已有研究指出,与B型相比,C型发展至慢乙肝和肝细胞癌机率更高^[5],李筠等^[6]对177例慢乙肝患者中医辨证与乙肝病毒脱氧核糖核酸(HBV-DNA)基因型的关系进行了研究分析,尚未有结果提示HBV基因型与中医证型之间具有明显相关性。目前对于抗病毒治疗后,出现的HBV-YMDD变异与中医虚实证型之间已发现具有一定程度相关性,张玮等^[7]对拉米夫定抗病毒治疗半年以上的慢乙肝患者通过基因芯片进行HBV-YMDD变异检测,发现HBV-YMDD变异率实证组明显高于虚证组($P < 0.01$)。而对临床乙型肝炎E抗原(HbeAg)阴性患者按中医辨证,采用

HBV突变检测基因芯片检测,发现基本核心启动子(basic core promoter mutation, BCP)区和/或前C区变异在实证患者中变异率低于虚证患者^[8]。另有对慢乙肝HbeAg阴性,中医辨证肝郁脾虚证和湿热中阻证患者的C基因型和前C变异率进行统计分析,发现肝郁脾虚证患者C基因最为常见,更易发生前C区变异和BCP、前C区双变异^[9],与之前结果一致,考虑HbeAg阴性患者大多病程较长,因实致虚所致。对HbeAg阳性的慢乙肝轻、中度患者HBV-DNA定量,研究发现慢乙肝实证组患者HBV-DNA定量水平高于虚实兼夹组和虚证组($P < 0.05$)^[10]。

由以上临床报道可见,慢乙肝病毒基因型感染与人体虚实证候无必然联系,而在治疗过程中,常见的药物治疗引起的乙肝病毒YMDD变异以实证多见,考虑为实证患者临床症状、体征明显,药物治疗疗程长,剂量较大等所致病毒变异率增高。临床报道HbeAg阴性患者变异以虚证者为多,则考虑因素多为病程较长,因实致虚所致。故上述慢乙肝中医虚实辨证与乙肝病毒分子基因型与变异之间的相关性研究,对于临床治疗提出了警示:实证患者经抗病毒治疗后和病程较长的迁延至虚证慢乙肝患者病毒变异率高,应及时监测,及早采取病毒变异的防治对策。

2 慢乙肝中医虚实辨证相关免疫学研究

HBV是一种非侵袭性嗜肝病毒,感染人体后并不直接损害肝脏,而是由其表达的抗原系统及其抗体所介导的特异性免疫反应和非特异性的以细胞因子为主的炎性介质导致的肝细胞损伤。其中病毒抗原特异性细胞毒T淋巴细胞(CTL)是抗病毒免疫应答的主要效应细胞,而决定宿主免疫应答能力最重要的遗传因素是人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)的等位基因多态性^[11]。HLA等位基因多态性与HBV感染结局有着重要联系,目前国内外相关领域研究正成为慢性HBV感染发生发展过程中宿主免疫因素的热点^[12]。对慢乙肝中医辨证实证(湿热中阻、肝郁脾虚、瘀血阻络)和虚证(脾肾阳虚、肝肾阴虚)患者用序列特异性引物聚合酶链反应法(SSP-PCR)对HLA-DRB1位点进行HLA分型检测,分析发现HLA-DRB1虚证组呈低表达,反映出了中医证型与HLA的等位基因多态性有相关性,可能也与虚、实证型不同临床转归有一定相关性^[13]。荀运浩等^[14]对湿热质、阴虚质及平和

质等不同体质慢乙肝患者运用 HLA 基因分析芯片检测 HLA-DQA1 基因型,结果湿热质者较易或较早发生肝组织炎症而导致疾病进展,阴虚质、瘀血质者也倾向于出现不良结局,而阳虚质者更多保持病毒携带状态。

通过上述一系列研究,已初步探索了 HLA 等位基因多态性与中医虚实辨证之间的关联性,将 HLA 基因多态性,中医证型及不同转归的研究相结合,为临床上慢乙肝虚实证型不同临床转归提供了一定的分子生物学基础,目前开展的针对 HLA 作用靶点的慢乙肝中医药辨证治疗研究体现了中医个性化治疗的特点,为临床乙肝病毒感染后虚实证候差异临床表现与转归架起了分子生物学桥梁。

3 慢乙肝中医虚实辨证相关系统生物学研究

HBV 感染的自然病程是复杂和多变的,同时受很多因素的影响,中医辨证也存在着因虚致实、虚实夹杂、虚实转化等病机转变,故单从部分基因变化揭示中医虚实证型的客观物质基础尚显不足,近年来基因组学、功能基因组学和蛋白组学等相关分子生物学理论及技术的引入,为慢乙肝中医证型的深入研究带来了新的契机。

熊益群等^[15]应用人类全基因组芯片,对肝肾阴虚、湿热中阻及肝郁脾虚三证各 3 例患者进行基因表达谱分析,初步论证了慢乙肝中医证型之间的生物信息学差异。而后又有对慢乙肝虚实证型之间差异表达基因结构、功能及涉及通路进行更进一步的研究,管艳等^[16]通过检测和分析慢乙肝肝肾阴虚和湿热蕴结证患者差异基因表达谱,研究结果提示肝肾阴虚证和湿热蕴结证均存在单独调变基因及功能的差异,并运用实时荧光定量 PCR 反应验证了 ATP 结合盒亚家族 C 成员 3 (ABCC3)、过氧化物酶增殖体激活受体 α (PPAR α) 等基因表达与芯片结果一致性,并发现 ABCC3 mRNA 的表达在肝肾阴虚证和湿热蕴结证患者差异有统计学意义 ($P < 0.05$),这不仅反应了慢乙肝肝肾阴虚和湿热蕴结证患者白细胞中差异表达基因,也揭示了慢乙肝虚、实证型之间分子学差异。杨婵娟等^[17]通过基因芯片检测慢乙肝肝郁脾虚证与脾胃湿热证患者的差异表达基因,发现了两证型间的差异表达基因,并通过动态网络构建,找出共表达能力差异最显著的 9 个基因,其中上调基因中 FLJ22536、PTPRF 和 TS-PAN33 在肝郁脾虚证中表达较强,LOC340508、MPL

和 TUBA8、NT5M、EGFL7 在脾胃湿热证中表达能力较强,为进一步对慢乙肝虚、实证型之间的分子机制研究提供了思路和方向。

较之于基因组学与转录组学,蛋白组学更直接,目标性更明确,为慢乙肝中医辨证提供了更接近临床的生物信息学结果。王磊琼等^[18]运用蛋白组学方法,寻找慢乙肝肝肾阴虚和脾肾阳虚证患者血浆中差异表达的蛋白质,归纳总结了此二虚证载脂蛋白 A2,血清结合珠蛋白表达量均明显下降,提示慢乙肝肝肾阴虚和脾肾阳虚证之间具有相同的蛋白质变化规律,为慢乙肝虚证形成的机制研究奠定了基础。张国良^[19]用白细胞介素-2、干扰素- γ 、白介素-4、干扰素- α 、转化生长因子- β 1、可溶性细胞间粘附因子-1、组织金属蛋白抑制因子-1 等细胞因子作为研究目标,构建蛋白芯片用于慢乙肝患者血清上述细胞因子检测,慢乙肝患者不同中医证型与血清细胞因子有一定相关性,但未显示出明确虚实证型间差异。魏岷等^[20]采用双向凝胶电泳 (2-DE) 技术结合质谱分析等生物信息学分析方法对慢乙肝湿热中阻证患者与健康对照组血浆全蛋白进行比较蛋白质组学分析,发现 7 个差异表达蛋白质,其中载脂蛋白 A1、载脂蛋白 A4 为揭示慢乙肝湿热中阻证的发病分子机制提供了实验依据。

4 结语与展望

辨证论治是中医治疗的优势也是特色,更是保证临床疗效的根本,已有众多医家学者分别从临床症状^[21]、病理分期分级^[22]、实验室生化指标^[23]及细胞免疫学^[24]等方面开展了慢乙肝的中医证型客观化研究,并取得一定成果,也揭示出中西医有其共通之处。近年来生命科学及相关技术的发展迅速,为研究者从多学科、多角度进一步认识中医证的本质提供了更多的方法学基础和技术条件。中科院院士沈自尹教授^[25]也提出“利用功能基因组学的研究成果,建立中医‘证’的基因表达谱,将是 21 世纪中医药学的主要发展方向”。均提示从基因表达调控和基因产物的功能入手,是现代生物医学领域研究发展的趋势,也是不断揭示重大医学问题的根本。

综上,目前通过分子生物学与临床大样本流行病学调查研究相结合,揭示出了慢乙肝中医虚实证候在免疫学、病毒学及系统生物学等领域客观存在的分子生物学差异,而其之间相互联系并与慢乙肝中医虚实辨证之间的直接相关性仍在探索之中,下

一步将基因表达调控与修饰等分子机制(如DNA甲基化,miRNA,蛋白质剪切与磷酸化等)引入慢乙肝中医辨证分子生物学基础研究中,构建慢乙肝所涉及多学科相关基因转录、表达、调控及蛋白表达谱之间复杂分子网络,实现慢乙肝中医辨证与机体分子网络的直接联系,更符合中医“证”本质的整体性、复杂性及动态性,也将进一步推动慢乙肝中医虚实辨证甚至具体证型的生物学标准的建立。

参 考 文 献

- [1] 张诗军,陈泽雄,等. 和解汤对慢性乙型肝炎患者 HBeAg 阴转后阴转状态的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志,2001,9(2):92-93.
- [2] 郝瑞春,门九章,李孝波,等. 健脾温阳法治疗慢性乙型肝炎纤维化临床研究[J]. 上海中医药杂志,2011,45(3):34-35.
- [3] 范锡伟. 苦参素治疗慢性乙肝临床观察[J]. 山东医药,2005,45(25):72-73.
- [4] 张伯奥. 中医内科学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1985:182.
- [5] 许军,王齐欣,蒋栋,等. 乙型肝炎病毒基因型与病情轻重的关系[J]. 中华肝脏病杂志,2003,11(1):11-13.
- [6] 李筠,杨慧银,王立福,等. 慢性乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸基因型与中医辨证规律初探[J]. 中国中西医结合杂志,2010,30(10):1045-1047.
- [7] 张玮,王奕,贺德昌,等. HBV-YMDD 变异患者与中医虚实辨证关系初探[J]. 辽宁中医杂志,2004,31(9):731-732.
- [8] 肖倩. 慢性乙型肝炎 HBeAg 阴性患者乙肝病毒变异与中医辨证分型的关系[J]. 2006,47(6):454-455.
- [9] 肖倩,谭善忠,沈建军. 慢性乙型肝炎 e 抗原阴性患者肝郁脾虚证与 HBV 基因型和基因变异类型的相关性[J]. 中医杂志,2011,25(2):136-138.
- [10] 杨宏志,边壮,王拥泽,等. 慢性乙型肝炎虚实病机与病毒复制及 T 细胞关系的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志,2003,10(3):158-160.
- [11] de Andrade DR Jr, de Andrade DR. The influence of the human genome on chronic viral hepatitis outcome[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo,2004,46(3):119-126.
- [12] 陈冬梅,高冀荣,都特,等. HLA-DQA1 基因多态性与感染结局相关[J]. 基础医学与临床,2006,26(5):494-498.
- [13] 王融冰,周桂琴,江宇泳,等. 慢性乙型肝炎中医证型与 HLA-DRB1 位点表达探讨[J]. 中国中西医结合杂志,2007,27(10):898-899.
- [14] 苟运浩,施军平,过建春,等. 中医体质和 HBV 感染结局的关联及其与人类白细胞抗原-DQA1 基因多态性的关系[J]. 中国中西医结合杂志,2010,30(2):141-145.
- [15] 熊益群,姚小萍,周大桥,等. 慢性乙型肝炎肝郁脾虚生物信息学差异研究[J]. 中国中医药科技,2012,19(4):289-292.
- [16] 管艳,张辉,张玮,等. 慢性乙型肝炎病毒性肝炎肝肾阴虚证与湿热蕴结证患者外周血的差异基因表达谱分析[J]. 中西医结合学报,2012,10(7):751-756.
- [17] 杨婵娟,刘宏伟,王丽春,等. 慢性乙型肝炎肝郁脾虚证和脾胃湿热证患者的差异表达基因研究初探[J]. 中国中西医结合杂志,2012,32(8):1032-1036.
- [18] 王磊琼,段新科,董宝刚. 慢性乙型肝炎病毒性肝炎中医虚证的蛋白质组学规律初探[J]. 光明中医,2012,27(3):458-459.
- [19] 张国良. 应用蛋白芯片技术研究 HBV 慢性肝病中医证型与细胞因子的相关性[D]. 武汉:湖北中医学院,2007.
- [20] 魏媚,刘友平,郭芳宏,等. 慢性乙型肝炎湿热中阻证血浆蛋白质组学分析[J]. 中国中西医结合杂志,2011,31(10):1341-1345.
- [21] 刘亚敏,李英. 慢性乙型肝炎临床轻重程度与中医辨证分型关系初探[J]. 环球中医药,2012,5(7):530-531.
- [22] 肖和平,李从荣,等. 慢性乙型肝炎患者中医证型与肝脏病理、肝内IV型胶原免疫组化及血清肝纤维化指标的关系[J]. 中西医结合肝病杂志,2005,15(6):334-336.
- [23] 谢周杰,周晓霞,吴晓雷. 慢性乙型肝炎中医证型分型与临床检验关系的初步探讨[J]. 时珍国医国药,2005,16(3):226-227.
- [24] 李友白,薛博瑜,华忠,等. 慢乙肝中医辨证分型和细胞免疫功能关系的临床研究[J]. 江苏中医药,2012,44(1):21-22.
- [25] 沈自尹. 基因科学和 21 世纪中医药学的走向[J]. 上海中医药杂志,2000,2(10):7-8.

(收稿日期:2013-07-29)

(本文编辑:蒲晓田)

· 信息之窗 ·

《环球中医药》杂志期刊稿件采编系统 2014 年元旦上线

本刊社决定于 2014 年 1 月 1 日起,启用在线期刊稿件采编系统。系统入口位于《环球中医药》杂志官方网站 www.hqzyy.com 首页。

作者投稿本刊,请首先在本刊网站在线注册账号,以该账号登陆稿件采编系统投稿,并可以随时了解稿件编审进度。使用稿件采编系统十分方便作者和编辑的随时交流。

被邀请审阅稿件外审专家则会收到一封采编系统发出的邮件,其中包含账号和预设的密码,以及“查看稿件”、“开始审稿”、“登录系统”等字样的链接,通过点击这些链接实现与采编系统的交互,完成对稿件的评议。

同时编辑部将通过采编系统的短信功能,保持与作者、专家的沟通,保证整个稿件审编过程的流畅。

结合稿件采编系统上线,本刊网站将重新建设,新版面、新功能、新气象,欢迎浏览。

作者 2013 年所投稿件,继续通过本刊收稿邮箱 hqzyy@163.com 联络,如有问题可拨打本刊编辑部电话 010-65269860 交流。